



REC'D 16 AUG 2000

WIPO

PCT

PCT/FR 00 / 0 1 9 7 5

# BREVET D'INVENTION

FR 00/1975

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

10/030231

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 01 AOUT 2000

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ  
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**


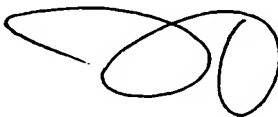
24 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75008 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire ou lettres capitales.

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES <b>8 JUIL 1999</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL <b>9908 58</b> DÉPARTEMENT DE DÉPÔT <b>75 INPI PARIS</b> DATE DE DÉPÔT <b>08 JUIL 1999</b>		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  <b>CABINET ORES</b> <b>6, avenue de Messine</b> <b>75008 PARIS</b>	
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° : date : Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> diffère <input checked="" type="checkbox"/> immédiat La demande, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non Titre de l'invention (200 caractères maximum) <b>PEPTIDES ANTI-MICROBIENS DE MOLLUSQUES</b>		n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone <b>MJPcb644/43FR</b>	
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN : code APE-NAF : Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination <b>1/ CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)</b> <b>2/ INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER (IFREMER)</b>  Nationalité (s) <b>Française</b> Adresse (s) complète (s) <b>1/ 3, rue Michel-Ange</b> <b>75794 PARIS CEDEX 16</b> <b>2/ 155, rue Jean-Jacques Rousseau</b> <b>92138 ISSY-LES-MOULINEAUX CEDEX</b>		Forme juridique <b>Etablissement public</b> <b>Etablissement public</b>  Pays <b>FRANCE</b> <b>FRANCE</b>	
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission			
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE pays d'origine : numéro : date de dépôt : nature de la demande :			
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° : date : n° : date :			
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire)   <b>Béatrice ORES (n° 92-4046)</b>		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI  	

**DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR**

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

**DEPARTEMENT DES BREVETS**

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08

Mjpcb644/43FR

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

990888

**TITRE DE L'INVENTION :**

**PEPTIDES ANTI-MICROBIENS DE MOLLUSQUES**

**LE(S) SOUSSIGNÉ(S)**

**CABINET ORES**

6, avenue de Messine  
75008 PARIS

**DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S)** (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- ROCH Philippe  
113, rue du Fesquet A1  
34080 MONTPELLIER, FRANCE
- MITTA Guillaume  
Résidence Le Maurétania n° 10  
Impasse Georges Costes  
34000 MONTPELLIER, FRANCE
- HUBERT Florence  
Résidence Le Gauguin, B3-333  
75, avenue du Pont Trinquat  
34000 MONTPELLIER, FRANCE
- NOEL Thierry  
8, rue Yves Montand  
34830 CLAPIERS, FRANCE

**NOTA :** A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 8 juillet 1999



Béatrice ORES (n° 92-4046)

# PEPTIDES ANTI-MICROBIENS DE MOLLUSQUES.

L'Invention est relative à de nouveaux peptides anti-microbiens produits par des mollusques.

Des polypeptides dotés de propriétés anti-microbiennes sont produits par une grande variété d'espèces (animales ou végétales), chez lesquelles ils participent à des mécanismes non-spécifiques de défense contre les infections.

Dans le cas des mollusques bivalves, on a jusqu'à présent identifié chez *Mytilus galloprovincialis*, un peptide dénommé MGD-1, apparenté aux défensines d'insectes [HUBERT et al., Eur. J. Biochem., 240, 302-306, (1996)] ; des peptides de la famille des défensines ont également été mis en évidence chez *Mytilus edulis*, ainsi que des peptides dénommés « mytilines » [CHARLET et al., J. Biol. Chem., 271, 21808-21813, (1996)] ;.

Les Inventeurs ont maintenant mis en évidence de nouveaux peptides anti-microbiens produits par *Mytilus galloprovincialis*, qui sont différents des défensines MGD1, et des Mytilines précédemment connues.

La présente invention a pour objet des peptides anti-microbiens, dénommés ci-après : « myticines » qui possèdent les caractéristiques suivantes :

- leur masse moléculaire est d'environ 4,5 kDa ;
- leur pI est d'environ 8,7 ;
- ils comprennent 8 résidus cystéine.

Selon un mode de réalisation préféré d'un peptide anti-microbien conforme à l'invention, il comprend la séquence (I) suivante (code 1 lettre) :

HX<sub>1</sub>HX<sub>2</sub>CTSYX<sub>3</sub>CX<sub>4</sub>KFCGTAX<sub>5</sub>CTX<sub>6</sub>YX<sub>7</sub>CRX<sub>8</sub>LHX<sub>9</sub>GKX<sub>10</sub>CX<sub>11</sub>CX<sub>12</sub>HCSR (I)  
 dans laquelle : X<sub>1</sub>= P ou S, X<sub>2</sub>= V ou A, X<sub>3</sub>= Y ou W, X<sub>4</sub>= S ou G, X<sub>5</sub>= S ou G, X<sub>6</sub>= R ou H, X<sub>7</sub>= G ou L, X<sub>8</sub>= N ou V, X<sub>9</sub>= R ou P, X<sub>10</sub>= L ou M, X<sub>11</sub>= F ou A, X<sub>12</sub>= L ou H.

Avantageusement, un peptide conforme à l'invention comprend l'une des séquences (Ia) ou (Ib) suivantes (code 1 lettre) :

HSHACTSYWCGKFCGTASCTHYLCRVLHPGKMCACVHCSR (Ia)

5 HPHVCTSYYSKFCGTAGCTRYGCRNLHRGKLCFCLHCSR (Ib)

Les séquences (Ia) et (Ib) représentent les formes matures, isolées à partir de l'hémolymph de *Mytilus galloprovincialis*, de 2 Myticines dénommées Myticine a et Myticine b, dont les ADNc ont également été  
10 clonés par les Inventeurs. A titre d'illustration de l'objet de la présente invention, les caractéristiques des Myticines a et b sont plus spécifiquement indiquées ci-après.

La séquence d'ADNc et la séquence  
15 polypeptidique de la Myticine a sont représentées dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID NO: 1 et SEQ ID NO: 2. La séquence d'ADNc et la séquence polypeptidique de la Myticine b, sont représentées dans la liste de séquences en annexe sous  
20 les numéros SEQ ID NO: 3 et SEQ ID NO: 4.

Le peptide actif de 40 acides aminés, correspondant à la séquence (I), et plus particulièrement à l'une des séquences (Ia) et (Ib) est flanqué d'une séquence signal de 20 acides aminés, et d'un peptide C-  
25 terminal de 36 acides aminés. La séquence signal permettrait l'adressage du produit de traduction vers le réticulum endoplasmique. Le peptide C-terminal permettrait ensuite l'adressage vers les granules cytoplasmiques dans lesquels les Myticines sont stockées  
30 sous forme mature et/ou la protection de la cellule contre une éventuelle activité cytolytique du peptide mature.

La masse moléculaire de la forme mature de la Myticine a est de 4438 Da ; la masse moléculaire de la  
35 forme mature de la Myticine b est de 4562 Da.

Les Myticines ne présentent aucune homologie significative avec les peptides anti-microbiens connus dans l'art antérieur, et définissent un nouveau groupe de peptides anti-microbiens.

5 Les Myticines peuvent être obtenues par extraction à partir des mollusques qui les produisent, ou bien par synthèse peptidique, ou, avantageusement, par génie génétique, en exprimant au moins une séquence d'acide nucléique codant une Myticine, dans une cellule  
10 hôte appropriée.

La présente Invention englobe également des acides nucléiques comprenant une séquence codant une Myticine, tel que définie ci-dessus.

Des acides nucléiques conformes à l'invention,  
15 peuvent être obtenus par criblage de banques d'acide nucléique à l'aide d'oligonucléotides dérivés des séquences SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3, ou de leurs séquences complémentaires. Les oligonucléotides utilisables dans ce but font également partie de l'objet  
20 de la présente invention ; avantageusement, ces oligonucléotides comprennent au moins 15 pb, et de préférence au moins 20 pb, de la portion codante de l'une des séquences SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3, ou de son complémentaire.

25 Les acides nucléiques conformes à l'invention englobent également les cassettes d'expression, comprenant au moins une séquence d'acide nucléique codant une Myticine, placée sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.

30 Par « promoteur approprié » on entend tout promoteur fonctionnel dans la cellule-hôte destinée à héberger la cassette d'expression. Il peut s'agir d'un promoteur constitutif ou d'un promoteur inductible ; il peut également s'agir, dans le cas où la cassette est  
35 destinée à l'expression d'une Myticine chez un animal ou une plante, d'un promoteur tissu-spécifique.

Une cassette d'expression conforme à l'invention peut comprendre également au moins une séquence codant une séquence d'adressage appropriée ; ladite séquence d'adressage peut être choisie parmi  
5 celles qui sont naturellement associées aux Myticines, telles que les séquences signal et/ou les séquences C-terminales associées aux isoformes Myticine a et Myticine b décrites ci-dessus ; il est également possible de choisir une ou plusieurs séquences d'adressage  
10 hétérologues, fonctionnelles dans une cellule-hôte donnée : il peut s'agir notamment de séquences permettant l'adressage d'une Myticine vers un compartiment cellulaire déterminé, ou sa sécrétion dans le milieu de culture.

15 L'Invention a également pour objet :

- des vecteurs recombinants caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins une séquence d'acide nucléique conforme à l'invention, codant une Myticine, et en particulier des vecteurs comprenant une cassette  
20 d'expression telle que définie ci-dessus.

- des cellules procaryotes ou eucaryotes transformées par au moins une séquence d'acide nucléique conforme à l'invention. Il peut s'agir de cellules en culture, ou de cellules faisant partie d'un organisme  
25 pluricellulaire, animal ou plante. La séquence d'acide nucléique conforme à l'invention présente dans une cellule transformée peut être soit incorporée dans l'ADN chromosomique de ladite cellule, soit être portée par un vecteur extra-chromosomique.

30 L'invention a également pour objet un procédé de production d'une Myticine, caractérisé en ce qu'il comprend l'expression de ladite Myticine, dans au moins une cellule transformée conforme à l'invention.

35 Les Myticines conformes à l'invention peuvent être exprimées dans des cultures de cellules transformées en utilisant des techniques similaires à celles utilisées



pour des peptides antimicrobiens de l'art antérieur, par exemple dans des cellules d'insecte, comme décrit par HELLERS et al. [Eur. J. Biochem. 199, pp. 435-439, (1991)] pour les cécropines, ou dans la levure, comme décrit par REICHHART et al. [Invertebrate Reproduction and Development, 21, pp. 15-24, (1992)].

Elles peuvent également être exprimées dans des animaux ou des plantes transgéniques, pour augmenter la résistance de ceux-ci aux infections, comme décrit par exemple par JAYNES et al., [Plant Science, 89, pp. 43-53 (1993)] dans le cas de peptides analogues de la cécropine B, exprimés dans des plants de tabac transgénique, ou par NORELLI et al. [Euphytica, 77, pp. 123-128 (1994)] pour des plants de pommiers transgéniques exprimant le gène de l'attacine-E.

Les Myticines sont utilisables en particulier pour l'obtention de produits et en particulier de médicaments anti-infectieux, par exemple anti-bactériens ou fongicides.

De tels produits trouvent leur application pour la prévention et le traitement de différentes maladies microbiennes, dans des secteurs très variés, en particulier dans les domaines de la santé et de l'agriculture, et dans celui de l'aquaculture, pour limiter le développement de maladies infectieuses dans les élevages.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de purification et de caractérisation des Myticines.

#### **EXEMPLE 1 : ISOLATION DE PEPTIDES ANTI-MICROBIENS A PARTIR DE L'HÉMOLYMPHE DE MYTILUS GALLOPROVINCIALIS.**

##### **Préparation des fractions de l'hémolymphe**

Une réaction immunitaire est induite chez des moules (*Mytilus galloprovincialis*) adultes selon le protocole suivant : la coquille est vidée de son liquide,

et 100 µl d'une suspension de bactéries ( $10^9$  bactéries/ml) ou de champignons (suspension d'hyphes à 1 DO à 600nm), préalablement tués par la chaleur sont injectés dans le muscle adducteur. L'hémolymphe (approximativement 0,5 ml/animal) est prélevée à partir du muscle postérieur adducteur à l'aide d'une seringue en présence de 1 volume de tampon anti-agrégant MAS (Modified Alsevier Solution) et centrifugée immédiatement à 800g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant, correspondant à la fraction plasmatique, est additionné d'aprotinine (5µg/ml) et congelé (-80°C) jusqu'à utilisation, et le culot cellulaire est séché et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

#### Purification des Myticines.

Fraction plasmatique : Le plasma est dilué (1:1 v/v) dans de l'eau stérilisée par ultrafiltration (MilliQ) additionnée de 0,1% d'acide trifluoroacétique. Le pH est amené à 3,9 par addition d'HCl 1M, sous agitation dans un bain-marie glacé pendant 30 min. Après centrifugation (10000 g, 20 min, 4°C) le surnageant est recueilli et maintenu à 4°C jusqu'à utilisation.

Hémocytes : Après décongélation le culot d'hémocytes est resuspendu dans 5 volumes de tampon Tris 50 mM, pH 8.7, contenant 50mM NaCl, et homogénéisé. Après centrifugation (10000 g, 20 min, 4°C), le culot contenant les organites cellulaires est repris dans 3 volumes d'acide acétique 2 M, et traité par sonication (3 X 30s) dans un bain-marie glacé. Après élimination des débris par centrifugation (10000 g, 20 min, 4°C) l'extrait acide est conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

#### Purification HPLC

La fraction plasmatique ou les extraits acides d'hémocytes sont déposés sur des colonnes SEP-PAK C18 VAC (WATERS ASSOCIATES) pré-équilibrées par de l'eau acidifiée (0,05% acide trifluoroacétique). Après lavage à l'eau acidifiée, on effectue 2 éluations successives par des solutions d'acétonitrile à 10% et 40% dans de l'eau

acidifiée (0,05% acide trifluoroacétique). Les fractions obtenues sont lyophilisées et reconstituées avec de l'eau ultrafiltrée avant d'être soumises à une chromatographie HPLC en phase inverse.

5                    Toutes les étapes de purification HPLC ont été effectuées sur un système HPLC BECKMAN GOLD HPLC équipé d'un détecteur BECKMAN 168. L'élution est suivie par mesure de l'absorption UV à 225 nm.

10                    Etape 1: les fractions éluées sur SEP-PAK à 40% d'acétonitrile sont déposées sur une colonne HPLC phase inverse SEPHASIL C18 (250 mm X 4,1 mm) (PHARMACIA). L'élution est effectuée par un gradient linéaire de 5 à 50% d'acétonitrile dans l'eau acidifiée, pendant 90 min à un débit de 0,9 ml/min. Les fractions correspondant aux  
15                    pics d'absorbance sont collectées dans des tubes de polypropylène (MICROSORB 75 X 12 mm, NUNC IMMUNOTUBES), séchées sous vide, et reconstituées avec de l'eau ultrafiltrée, préalablement au test de leur activité antimicrobienne.

20                    Etape 2: Les fractions actives récupérées à l'issue de l'étape 1 sont déposées sur une colonne HPLC phase inverse SEPHASIL C8 (250 mm X 4,1 mm) (PHARMACIA). L'élution est effectuée, à un débit de 0,9 ml/min, par un gradient linéaire de 20 à 30% d'acétonitrile dans l'eau  
25                    acidifiée pendant 40 min.

30                    Etape 3: Les fractions actives récupérées à l'issue de l'étape 2, sont déposées sur une colonne SEPHASIL C18, (250 mm X 4,1 mm) (PHARMACIA) en utilisant le gradient biphasique décrit dans l'étape 2, à un débit de 0,9 ml/min.

35                    Etape 4: La dernière étape de purification est effectuée sur une colonne phase inverse DELTA PAK HPI C18 (2 X 150 mm) (WATERS ASSOCIATES) en utilisant le gradient biphasique décrit dans l'étape 2, à un débit de 0,3 ml/min.

## EXEMPLE 2 : ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DES PEPTIDES OBTENUS

### Micro-organismes utilisés:

La liste des micro-organismes utilisés pour déterminer les activités anti-microbiennes de la Myticine a et de la Myticine b est indiquée ci-après, dans le Tableau 1

### Essais antibactériens et détermination de la CMB:

La concentration minimale bactéricide (CMB) des peptides a été déterminée selon le protocole décrit par HANCOCK et al. [<http://www.interchg.ubc.ca/bobh/methods.htm>].

On effectue une série de dilutions successives au 1/2 des peptides dans une solution aqueuse contenant 0,01% d'acide acétique et 0,2% de sérum albumine bovine (BSA).

Des aliquotes de 10 µl de chaque dilution sont incubées dans des plaques stériles de microtitration en polypropylène à 96 puits, en présence de 100 µl de suspension bactérienne à une densité optique de départ  $A_{600} = 0,001$  dans du milieu liquide MUELLER HINTON BROTH. L'incubation est effectuée pendant 18 h à 37°C sous agitation, sauf dans le cas des bactéries marines, pour lesquelles l'incubation est effectuée à 25°C. La CMB est déterminée en étalant sur milieu solide MUELLER HINTON AGAR le contenu des puits correspondant aux 3 premières dilutions pour lesquelles on n'observe aucune croissance bactérienne, et en incubant à 37°C pendant 18 heures. La plus faible concentration de peptide qui prévient toute formation résiduelle de colonies correspond à la CMB.

### Activité antifongique :

L'activité antifongique a été déterminée par calcul de la CMI (concentration minimale inhibitrice) dans un test d'inhibition de croissance de *Fusarium oxysporum* en phase liquide, selon le protocole décrit par FELHBAUM et al [J. Biol. Chem., 269:33159-63, (1994)].

On effectue une série de dilutions successives au 1/2 des peptides, comme indiqué ci-dessus pour la détermination de l'activité antibactérienne.

80µl de spores suspendues (concentration finale,  $10^4$  spores/ml) dans du milieu « Potato Dextrose Broth » (DIFCO) sont ajoutés à 10µl de solution de peptide dans des plaques stériles de microtitration en polypropylène à 96 puits. Le volume final est ajusté à 100µl par addition d'eau. L'inhibition de croissance est déterminée après une incubation de 24 heures à 25°C à l'obscurité, par observation au microscope et mesure de l'augmentation de la  $DO_{600}$ . La valeur de la CMI correspond à un intervalle (a-b) de concentrations en peptide, où (a) représente la concentration la plus élevée à laquelle on observe une croissance, et (b) représente la concentration la plus faible qui induit 100% d'inhibition de croissance.

#### Activité anti-protozoaire :

Le protozoaire parasite des huîtres, *Perkinsus marinus* est cultivé en milieu DMEM (GIBCO), selon le protocole décrit par GAUTHIER et VASTA [J. Invertebr. Pathol., 66, 156-168, (1995)].

10 µM de peptide purifié sont additionnés à  $4 \times 10^4$  *P. marinus*, dans de l'eau de mer (volume final 20 µl). Le mélange est incubé pendant 1 heure à température de la pièce. La viabilité des parasites est estimée par coloration à l'orange d'acridine et au bromure d'éthidium, comme décrit par MORVAN et al. [J. Invertebr. Pathol., 69, 177-82, (1997)]. La viabilité maximale est évaluée, à titre de contrôle positif, dans des échantillons dans lesquels le peptide n'a pas été ajouté.

Les résultats des différentes expérimentations effectuées, pour les peptides Myticine a et Myticine b sont illustrées par le Tableau 1 ci-dessous ; les activités biologiques sont exprimées en µM.

TABLEAU 1

	Myticine a	Myticine b
<b>BACTÉRIES</b>		
<b>Gram-positif</b>		
<i>Micrococcus luteus</i>	2,25-4,5	1-2
<i>Bacillus megaterium</i>	2,45-4,5	1-2
<i>Staphylococcus aureus</i>	>20	>20
<i>Listeria monocytogenes</i>	>20	>20
<i>Aerococcus viridans</i>	4,5-9	2-4
<i>Enterococcus faecalis</i>	>20	N.D
<b>Gram-négatif</b>		
<i>Escherichia coli</i> D31	>20	10-20
<i>Salmonella newport</i>	>20	>20
<i>S. typhimurium</i>	>20	>20
<i>Brucella suis</i>	>20	>20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>20	N.D
<i>Enteromonas aerogenes</i>	>20	N.D
<i>Vibrio alginolyticus</i>	>20	>20
<i>V. vulnificus</i>	>20	>20
<i>V. splendidus</i>	>20	>20
<b>CHAMPIGNONS</b>		
<i>Fusarium oxysporum</i>	>20	5-10
<b>PROTOZOAIRE PARASITE D'HUITRES</b>		
<i>Perkinsus marinus</i>	>20	>20

N.D : non déterminé

Ces résultats montrent que les 2 peptides sont actifs en particulier sur *Micrococcus luteus* ; le peptide Myticine b apparaît en outre plus actif que le peptide Myticine a sur *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, et *Fusarium oxysporum*.

### EXEMPLE 3 : CLONAGE DES ADN<sub>c</sub> DES PEPTIDES MYTICINE.

Une banque d'ADN<sub>c</sub> a été construite dans le vecteur ZAP EXPRESS (STRATAGENE) à partir des ARN poly(A)<sup>+</sup> totaux d'hémocytes de moules adultes. Une sonde d'ADN représentant 83 pb de l'ADN<sub>c</sub> de la Myticine a a été construite en utilisant le kit de clonage PCR SCRIPT Amp (SK+) (STRATAGENE), et marquée par amorçage aléatoire en utilisant le kit de marquage d'ADN READY-TO-GO (PHARMACIA), et utilisée pour cribler la banque d'ADN transférée sur membranes HYBOND-N, (AMERSHAM). Des hybridations à stringence élevée ont été effectuées pendant une nuit à 65°C en solution de Denhardt 5X, 5X SSPE, 0,1 %SDS, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon. Les

filtres préalablement rincés à 65°C en solution 0,5 X SSC contenant 0,1 % SDS, ont été autoradiographiés. Un criblage secondaire a été effectué pour purifier les clones positifs. Les phagemides ont été obtenus par  
5 excision *in vivo* et leurs 2 brins ont été séquencés.

110 clones positifs ont été obtenus. Parmi ces clones, 4 ont été séquencés, et correspondent aux peptides Myticine a et Myticine B.

Dans les 2 cas, la séquence en acides aminés  
10 déduite du cadre de lecture ouverte commence par un peptide signal de 20 acides aminés ; ce peptide-signal est directement suivi, à son extrémité C-terminale, par un peptide de 40 acides aminés, débutant par un résidu histidine, qui correspond à la forme active du peptide ;  
15 ce peptide actif est suivi par une extension C-terminale de 36 acides aminés.

## LISTE DE SEQUENCES

<110> CNRS  
IFREMER

<120> Peptides anti-microbiens de mollusques

<130> MJPCb644/43

<140>

<141>

<160> 4

<210> 1

<211> 663

<212> ADN

<213> *Mytilus galloprovincialis*

<220>

<221> CDS

<222> (43)..(330)

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (103)..(222)

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (43)..(102)

<400> 1

aaggataata ttttgattta actgcaaact caaacgtaca at atg aag gca aca 54  
Met Lys Ala Thr  
-20

atc ttg tta gca gtt cta gtg gca gtc ttt gtc gca ggt acg gaa gct 102  
Ile Leu Leu Ala Val Leu Val Ala Val Phe Val Ala Gly Thr Glu Ala  
-15 -10 -5 -1

cat tcg cac gct tgt aca tca tac tgg tgt ggt aag ttt tgt gga act 150  
His Ser His Ala Cys Thr Ser Tyr Trp Cys Gly Lys Phe Cys Gly Thr  
1 5 10 15

gct agt tgc aca cat tat cta tgc aga gta ctc cat ccc ggt aaa atg 198  
Ala Ser Cys Thr His Tyr Leu Cys Arg Val Leu His Pro Gly Lys Met  
20 25 30

tgc gca tgt gtt cat tgc agc agg gtg aac aat cct ttc aga gtt aat 246  
Cys Ala Cys Val His Cys Ser Arg Val Asn Asn Pro Phe Arg Val Asn  
35 40 45

caa gtt gct aaa agt att aac gat ttg gat tac act cca ata atg aag 294  
Gln Val Ala Lys Ser Ile Asn Asp Leu Asp Tyr Thr Pro Ile Met Lys  
50 55 60

tcg atg gaa aac ttg gac aat gga atg gat atg tta taagcaaaca 340  
Ser Met Glu Asn Leu Asp Asn Gly Met Asp Met Leu  
65 70 75



acttatgcaa tgcagatcac aactgtgaat ctttgctatc attctcactg cttttcacct 400  
 ttcaacaaac gaaaaattat cagcaacttg aaaaataaca aacttgagtc atgtctgttc 460  
 agtttccagt ctaatatatta tatcattata tgaaaggtat aacaaaatta gtaccattgt 520  
 gttctaataag aaacaattta taaacaagaa acattacact ttaagtataa attaacagga 580  
 ttttgtcctg cagctgtttt atctttcttt tctcagctat agtcttctga ttgtaataaa 640  
 atagcttgaa aaaaaaaaaa aaa 663

<210> 2  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> *Mytilus galloprovincialis*

<400> 2  
 Met Lys Ala Thr Ile Leu Leu Ala Val Leu Val Ala Val Phe Val Ala  
     1                    5                    10                    15  
 Gly Thr Glu Ala His Ser His Ala Cys Thr Ser Tyr Trp Cys Gly Lys  
                     20                    25                    30  
 Phe Cys Gly Thr Ala Ser Cys Thr His Tyr Leu Cys Arg Val Leu His  
                     35                    40                    45  
 Pro Gly Lys Met Cys Ala Cys Val His Cys Ser Arg Val Asn Asn Pro  
     50                    55                    60  
 Phe Arg Val Asn Gln Val Ala Lys Ser Ile Asn Asp Leu Asp Tyr Thr  
     65                    70                    75                    80  
 Pro Ile Met Lys Ser Met Glu Asn Leu Asp Asn Gly Met Asp Met Leu  
                     85                    90                    95

<210> 3  
 <211> 681  
 <212> ADN  
 <213> *Mytilus galloprovincialis*

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (13)..(300)

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (73)..(192)

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (13)..(72)

<400> 3  
 caaacgtaca ac atg aag gca aca atg ttg tta gca gtt gta gtg gct gtc 51  
                     Met Lys Ala Thr Met Leu Leu Ala Val Val Val Ala Val  
                     -20                    -15                    -10

ttt gtc gca ggt aca gaa gct cat ccg cat gtt tgc aca tcg tac tac 99  
 Phe Val Ala Gly Thr Glu Ala His Pro His Val Cys Thr Ser Tyr Tyr  
                   -5                  -1 1                  5  
 tgt agc aag ttt tgt ggg act gct ggt tgc aca cgt tat gga tgc cga 147  
 Cys Ser Lys Phe Cys Gly Thr Ala Gly Cys Thr Arg Tyr Gly Cys Arg  
   10                  15                  20                  25  
 aat ctc cat cgc ggg aag ctt tgc ttc tgt ctt cat tgc agc agg gtg 195  
 Asn Leu His Arg Gly Lys Leu Cys Phe Cys Leu His Cys Ser Arg Val  
                   30                  35                  40  
 aag ttc ccg ttt gga gca act caa gat gct aaa agt atg aac gaa ctg 243  
 Lys Phe Pro Phe Gly Ala Thr Gln Asp Ala Lys Ser Met Asn Glu Leu  
                   45                  50                  55  
 gaa tac act cca ata atg aag tcg atg gaa aat ttg gac aac gga atg 291  
 Glu Tyr Thr Pro Ile Met Lys Ser Met Glu Asn Leu Asp Asn Gly Met  
                   60                  65                  70  
 gat atg tta taagcaaact tatgacatga agatcacaac tgtatacttt 340  
 Asp Met Leu  
                   75  
 tgctattcct gtatccgctt tactcctttc ttcacacttt gtacggaatc cgtcaacaga 400  
 aaattcatca tcaacttgaa aactaacaaa agatgtgtcg cacacgttac actcaccagt 460  
 ccataagtta tatcattaaa aaaagatgaa tcaagttacc gttaacgtgt gttcagatat 520  
 atctctgaca gaagaagtaa ctgttaacaa gaaatactgt tttccctcaa gttattaaaa 580  
 attagaagtc tccttgcaac tgttttatct ttccttactc agttcttttt tcatgttcta 640  
 ataaaacagt ttgaaatgaa caaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 681

<210> 4  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> *Mytilus galloprovincialis*

<400> 4  
 Met Lys Ala Thr Met Leu Leu Ala Val Val Val Ala Val Phe Val Ala  
   1                  5                  10                  15  
 Gly Thr Glu Ala His Pro His Val Cys Thr Ser Tyr Tyr Cys Ser Lys  
                   20                  25                  30  
 Phe Cys Gly Thr Ala Gly Cys Thr Arg Tyr Gly Cys Arg Asn Leu His  
                   35                  40                  45  
 Arg Gly Lys Leu Cys Phe Cys Leu His Cys Ser Arg Val Lys Phe Pro  
                   50                  55                  60  
 Phe Gly Ala Thr Gln Asp Ala Lys Ser Met Asn Glu Leu Glu Tyr Thr  
   65                  70                  75                  80  
 Pro Ile Met Lys Ser Met Glu Asn Leu Asp Asn Gly Met Asp Met Leu  
                   85                  90                  95

# REVENDECATIONS

- 1) Peptide anti-microbien, dénommé myticine, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu à partir d'un mollusque bivalve, et en ce que
  - sa masse moléculaire est d'environ 4,5 kDa ;
  - son pI est d'environ 8,7 ;
  - il comprend 8 résidus cystéine.
- 2) Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence (I) suivante :
 

HX<sub>1</sub>HX<sub>2</sub>CTSYX<sub>3</sub>CX<sub>4</sub>KFCGTAX<sub>5</sub>CTX<sub>6</sub>YX<sub>7</sub>CRX<sub>8</sub>LHX<sub>9</sub>GKX<sub>10</sub>CX<sub>11</sub>CX<sub>12</sub>HCSR (I)

dans laquelle : X<sub>1</sub>= P ou S, X<sub>2</sub>= V ou A, X<sub>3</sub>= Y ou W, X<sub>4</sub>= S ou G, X<sub>5</sub>= S ou G, X<sub>6</sub>= R ou H, X<sub>7</sub>= G ou L, X<sub>8</sub>= N ou V, X<sub>9</sub>= R ou P, X<sub>10</sub>= L ou M, X<sub>11</sub>= F ou A, X<sub>12</sub>= L ou H.
- 3) Peptide selon la revendication 2, choisi dans le groupe constitué par :
  - un peptide comprenant la séquence (Ia) suivante :
 

HSHACTSYWCGKFCGTASCTHYLCRVLHPGKMCACVHCSR (Ia)
  - un peptide comprenant la séquence (Ib) suivante :
 

HPHVCTSYCYCSKFCGTAGCTRYGCRNLHRGKLCFCLHCSR (Ib)
- 4) Acide nucléique comprenant une séquence codant pour un peptide selon une quelconque des revendications 1 à 3.
- 5) Oligonucléotide comprenant un segment d'au moins 15 pb, et de préférence au moins 20 pb d'un acide nucléique selon la revendication 4.
- 6) Cassette d'expression, comprenant au moins une séquence d'acide nucléique selon la revendication 4, sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.
- 7) Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence d'acide nucléique selon la revendication 4.

8) Cellule procaryote ou eucaryote transformée par une séquence d'acide nucléique selon la revendication 4.

5 9) Procédé de production d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend l'expression d'un acide nucléique selon la revendication 4, dans au moins une cellule transformée selon la revendication 8.

10 10) Utilisation d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour l'obtention d'un agent anti-microbien.

---